УДК 591.84:597.6

Е. И. Домашевская

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК НАДКОСТНИЦЫ У АМФИБИЙ

В специальной литературе имеются немногочисленные общие сведения о развитии скелета длинных трубчатых костей у амфибий (Кащенко, 1896; Eggeling, 1911; Lubosch, 1928; Румянцев, 1958; Житников, 1980; Домашевская, 1984, 1989). При этом фактически отсутствует информация о пролиферативных потенциях клеток надкостницы, которая играет большую роль в аппозиционном росте кости. Для более полного выяснения особенностей роста и развития скелета у амфибий представляется важным изучение не только структуры надкостницы, но и пролиферативных потенций ее клеток.

Исследование проводили на личинках, масса которых составляла 4—5 г, и на одногодичных чесночницах (*Pelobates fuscus*). ^{3}H-тимидин вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 74 кБк/г живой массы с последующей фиксацией периоста с подлежащим слоем компакты бедренной кости в 10 %-м нейтральном формалине через 1; 24 и 48 ч (личинки) и через 1; 24 и 72 ч (лягушата).

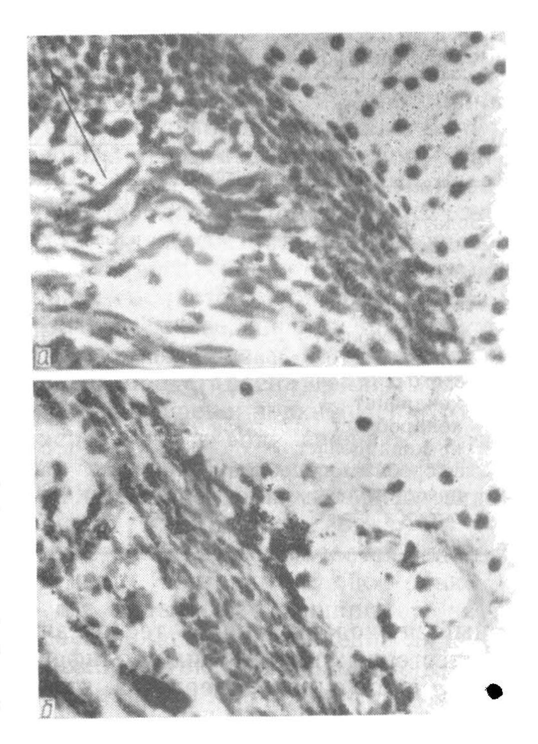
На гистоавтографах с ^{3}H-тимидином определяли (в %) отношение меченых клеток к общему числу клеток на условную единицу площади гистологического среза, а также интенсивность синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты по концентрации метки над ядром клетки (интенсивность мечения). Митотический индекс ядер вычислялся на 1000 клеток. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики (Терентьев, Ростова, 1977).

В период развития личинки (стадия 46, 47, 49 по Н. В. Дабагяну) надкостница длинных трубчатых костей в зонах закладки кости диафиз, метафиз и «переходная зона» различна по толщине (количеству клеточных рядов) и функциональным проявлениям клеток. Так, у личинок (на стадии 46) надкостница начинает дифференцироваться в диафизарной зоне будущей кости в период, когда хрящевая закладка подготовлена к замещению. В самом глубоком слое перехондра еще до появления здесь костной манжетки клетки приобретают характерный вид остеобластов и начинают продуцировать фермент — щелочную фосфатазу. В это время у земноводных отмечается типичное для амфибий грибовидное разрастание хрящевого эпифиза, края которого далеко заходят на метафизы. Клетки надкостницы в «переходной зоне» (на границе перихондр — надкостница) расположены в 2—3 ряда, из которых внутренний слой состоит из остеобластов, а поверхностный — хондробластов. В концевом верхушечном отделе щели, куда край костной трубки не доходит, содержатся только хондробласты (рисунок, *а*).

Уже через час после введения ^{3}H-тимидина индекс мечения клеток, как по слоям перихондра, так и по зонам хрящевой закладки кости, неодинаков (рисунок, *б*): он, во-первых, значительно выше в озне диафиза закладки кости и, во-вторых, большой процент меченых ядер отмечается в его поверхностном слое. Следует обратить внимание на то, что и показатель митотического деления этих клеток выше (табл. 1).

Очевидно, суммарный показатель концентрации всех клеток надкостницы, как и фракции пометившихся в каждой зоне закладки кости, непосредственно связан с интенсивностью протекающего здесь перихондрально-периостального остеопластического процесса. Так как в метафизарной зоне прирост идет пока медленно, то здесь и сосредоточено на эквивалентной площади минимальное количество пролиферирующих клеток.

Примерно такая же картина распределения клеток в зоне метафиза сохраняется и спустя 24 ч после введения ^{3}H-тимидина (личинки дости-



Гистоавтографы надкостницы бедренной кости личинки *P. fuscus* на стадии 47 (по Н. В. Дабагяну). Видны многочисленные меченые клетки надхрящницы *(а)* и надкостницы зоны диафиза *(в)* через 1 ч после внутрибрюшинного введения ^{3}Н-тимидина (Гемат.-эозин Делафильда; об. 40. ок. 7).

гают 47-й стадии развития), однако к этому времени весомо (почти в 2 раза) уменьшается интенсивность мечения клеток поверхностного слоя — свидетельство происшедшего за это время их деления (от 13 до 27 %). В это время перихондральная костная трубка в области диафаза приобретает несколько большие размеры по длине и массе. Если на предыдущей стадии зачаток костного диафиза выглядел на гистологическом срезе как тонкая (10—12 мкм) пластинка, то на стадии 47 толщина ее достигает 24 мкм, и в ней уже имеются единичные остеоциты. Параллельно с этим следует отметить количественную прибавку меченых остеобластов (с 17 до 38 %) и незначительное количество меченых фибробластоподобных клеток. Однако если прибавка меченых остеобластов произошло за счет созревания как помеченных преостеобластов, так и деления самих остеобластов, то содержащие метку фибробластоподобные клетки распределяются в пределах своей же популяции поверхностного слоя.

Спустя 48 ч после введения ^{3}Н-тимидина можно отметить следующее: 1) заметно прогрессирует фракция меченых клеток в глубоком слое (зона диафиза) при одновременном значимом снижении индекса мечения клеток поверхностного слоя, т. е. пополнение остеобластов, по-видимому, происходит за счет клеток поверхностного слоя периода; 2) часть меченых клеток метафиза разделилась повторно. Метка над ядрами некоторых клеток стала на уровне фона, и они не учитывались при подсчете.

Следовательно, сам собой напрашивается вывод о том, что интенсивность остеопластического процесса в растущей закладке кости в дан-

Таблица 1. Показатели пролиферации клеток в перихондре закладки бедренной кости личинки чесночницы

Клетки	Время после введения ^{3}Н-тимидина, ч						Митотический индекс
	1		24		48		
	I	II	I	II	I	II	
Зона диафиза							
клетки глубокого слоя	17	30,5±0,1	38	14,0±0,3	49	11,4±0,2	0,4
клетки поверхностного слоя	35	20,0±0,2	39	17,3±0,4	16	8,9±0,5	0,2
Зона метафиза							
клетки глубокого слоя	15	9,5±0,1	8	7,6±0,3	4	5,0±0,2	0,1
клетки поверхностного слоя	13	25,0±0,3	27	11,0±0,4	10	8,5±0,2	0,2

Примечание. В табл. 1 и 2: I — индекс меченых ядер, %; II — интенсивность мечения ядер.

Таблица 2. Показатели пролиферации клеток в надкостнице бедренной кости чесночницы (возраст 1 год)

Клетки	Время после введения ^{3}H-тимидина, ч						Митотический индекс
	1		24		72		
	I	II	I	II	I	II	
Зона диафиза							
остеобласт	—	—	2	4,2±0,3	3	5,4±0,4	—
преостеобласт	6	7,7±0,5	4	6,2±0,2	3	9,4±0,3	0,01
Зона метафиза							
остеобласт	5	26,1±0,5	9	8,4±0,1	4	7,4±0,1	0,01
преостеобласт	7	40,9±0,4	17	6,6±0,9	6	4,9±0,7	0,02
фибробластоподобные клетки	6	12,4±0,6	10	7,3±0,1	5	4,8±0,5	0,01
Переходная зона							
хондроцит	—	—	—	—	3	8,5±0,3	—
хондробласт	—	—	4	6,5±0,7	12	6,3±0,1	0,01
прехондробласт	8	51,0±0,3	18	20,7±0,2	6	9,0±0,3	0,02
фибробластоподобные клетки	19	50,8±0,4	2	25,6±0,2	5	12,6±0,4	0,03
преостеобласт	16	60,6±0,4	53	22,2±0,8	8	8,5±0,3	0,02
остеобласт	—	—	21	6,1±0,7	19	4,6±0,4	0,01

ный период онтогенеза тесно связана с количественной концентрацией остеогенных клеток и их пролиферирующих единиц в каждой конкретной зоне перихондра — периоста, что в конечном счете и скажется на росте скелетных звеньев в целом.

Для того чтобы удостовериться в возможности этого, мы поставили дополнительный опыт на одногодичных чесночницах при тех же режимах введения ^{3}H-тимидина в организме. Перед началом изложения результатов данного исследования отметим, что у годичной лягушки диафизарная область бедренной кости уже полностью сформирована, ростовые процессы сохраняются еще в метафизах и значительно активно протекают в переходной зоне.

В отличие от надкостницы более ранних стадий развития личинок у лягушек на этой стадии онтогенеза остеобласты в периосте диафиза уже приобретают форму удлиненных клеток с плотным штриховидным ядром. Такой метаморфоз остеогенных клеток, по-видимому, связан с переходом надкостницы диафизарной зоны кости в состояние более зрелой тканевой дифференцировки, для которой удлиненная форма остеогенных клеток является обычной. Несмотря на изменение формы, их количество на равной протяженности периоста сохраняется в пределах 17—20 единиц на 250 мкм.

Естественно, возникает вопрос: каким путем пополняется состав остеогенных клеток в надкостнице, за счет каких источников?

При анализе полученных гистоавтографов оказалось, что спустя час после введения ^{3}H-тимидина в надкостнице диафиза отмечаются всего единичные (до 6 %) меченые клетки среди преостеобластов (табл. 2). В надкостнице зоны метафизов регистрируются меченые клетки всех видов зрелости (остеобласты, преостеобласты и фибробластоподобные клетки), однако их процент невысок (от 5 до 7 %). В то же время в «переходной зоне» индексы мечения ядер над этими видами клеток немного выше, а над преостеобластами и фибробластоподобными клетками индексы мечения ядер почти в 3 раза выше, чем в надкостнице зоны метафиза кости.

Через 24 ч после начала опыта в зоне диафиза по-прежнему регистрируются невысокие проценты меченых ядер над клетками — 2—4 %, в то время как над ядрами клеток метафиза и переходной зоны — значительно выше. Так, над прехондробластами индекс мечения ядер — 18 %, а над преостеобластами — 53 % (табл. 2). При этом отмечается снижение на половину интенсивности метки (с 60 до 22 зерен восстановленно-

го серебра), спустя 24 ч мы учли фактически популяцию поделившихся ранее помеченных клеток.

В метаэпифизарных зонах под грибовидной муфтой эпифизарного хряща продолжает существовать периостально-перихондральный участок, в котором на границе с гиалиновым хрящом клетки такого тканевого образования дифференцируются в хондробласты, а на границе с костью и кровеносными сосудами — в остеобласты. Поверхностный слой надкостницы, как и на предыдущих стадиях, состоит из волокнистого каркаса с включенными клетками различного уровня дифференцировки — от фибробластоподобных до преостеобластов. Пополнение клеток в ней происходит преимущественно за счет менее дифференцированных состояний, и частично за счет функционально зрелых остеобластов. То есть, надкостница у земноводных здесь представлена единым слоем: включающим клетки различных стадий дифференцировки.

При анализе гистоавтографов через 72 ч в зоне диафиза кости в надкостнице отмечается по-прежнему невысокий индекс мечения ядер клеток (табл. 2). Среди ядер клеток надкостницы зоны метафизов индексы мечения ядер также невысоки.

При этом над фибробластоподобными клетками отмечается (табл. 2) и разбавление метки, то есть имеет место, по-видимому, не только их деление, но и трансформация в другие ряды клеток, например, за их счет идет пополнение популяции преостеобластов. Понижение индексов мечения ядер наблюдается и над ядрами клеток переходной зоны, с одной стороны, за счет уменьшения прехондробластов мы имеем увеличение процента хондробластов, а с другой стороны — за счет ранее меченых преостеобластов — значительный еще процент меченых остеобластов (19 %).

Преостеобластические состояния, судя по всему, представляют собой основной клеточный фонд растущей надкостницы, так как фибробластоподобные формы пролиферируют (по радиоактивному индексу) в пределах 16—19 % (табл. 2). Картина гисторадиографии интересна не столько этими данными, сколько возможностью достоверно убедиться в гистогенетической преемственности разнодифференцированных клеток надкостницы. В самом деле, в течение суток можно отметить достоверное пополнение фракции меченых остеобластов за счет дифференцировки ранее пометившихся преостеобластов, что заметно по численной прибавке остеобластов с половинной интенсивностью метки, характерной для разделившихся преостеобластов. Однако даже в условиях кратковременного опыта заметна тенденция перехода небольшой доли помеченных клеток фибробластоподобных в слой преостеобластов. Тенденция доминирующего пролиферирования менее дифференцированных клеток для пополнения состава более дифференцированных клеток самого внутреннего слоя хорошо заметна еще в перихондре до начала периостального остеогенеза. В приводимой здесь табл. 1 наглядно выступает преобладающая экстенсивность мечения среди поверхностно расположенных клеток перихондра. Затем на последующих этапах наблюдения (через 24, 48 ч), когда свободно циркулирующего в организме ^{3}H-тимидина уже нет, заметно прогрессирует фракция меченых клеток в глубоком слое при одновременном значимом снижении индекса мечения клеток поверхностного слоя. При этом следует отметить, что ключевой этап периостального остеогенеза всегда начинается с налаживанием остеогенной функции в клетках перихондра, поэтому структуру перихондра есть основания считать как исходную для дифференцировки в периост. Но совершенно ясным следует признать и то, что даже в сформированной зоне костного скелета (диафизе) клетки надкостницы в какой-то мере сохраняют пролиферативные свойства, возможно, необходимые не столько для роста кости, сколько для ее адаптивного ремоделирования и физиологической регенерации.

В специальной литературе нет данных о пролиферативных свойст-

вах клеток надкостницы у земноводных. Такие сведения получены методом авторадиографии с меченым предшественником ДНК — ^{3}H-тимидином для млекопитающих (Owen, 1963; Топпа, 1965; Мажуга, Хрисанфова, 1985; Родионова, 1989). В этих работах отмечается низкая пролиферативная активность клеток поверхностного слоя надкостницы у крысы.

Полученные нами данные согласуются с предположением других авторов (Левикова, 1950; Prichard, 1952; Burger et al. 1986), допускающих возможное участие клеток поверхностного слоя надкостницы в пополнении его остеогенных клеток и в какой-то мере дополняют имеющиеся в специальной литературе данные о свойствах пролиферации клеток надкостницы у других позвоночных.

Дабагян Н. В., Слепцова Л. А. Таблица нормального развития травяной лягушки Rana temporaria // Объекты биологии развития.— М.: Наука, 1975.— С. 442—463.
Домашевская Е. И. Особенности строения надкостницы у некоторых позвоночных // Вестн. зоологии.— 1984.— № 4.— С. 21—34.
Домашевская Е. И. Особенности строения надкостницы у безхвостых амфибий // Там же.— 1982.— № 2.— С. 42—46.
Житников А. Я. Морфология хондрогенеза и кинетика репродукции хондроцитов при развитии хрящевого скелета // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1980.— № 7.— С. 69—74.
Кащенко Н. Ф. Что такое мезенхима? // Изв. Томск. ун-та.— 1896.— № 10.— С. 1—24.
Левикова В. П. Наблюдения над экспериментальным остеогенезом у кролика // Докл. АН СССР.— 1950.— **71**, № 1.— С. 149—152.
Мажура П. М., Хрисанфова Е. Н. Очерки эволюции человека.— Киев: Наук. думка, 1985.— 136 с.
Родионова Н. В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе.— Киев: Наук. думка, 1989.— 185 с.
Румянцев А. В. Опыт исследования эволюции хрящевой и костной тканей.— М.: Медицина, 1958.— 439 с.
Burger B. H., Boonekamp P. M., Niyweide P. J. Osteoblast and osteoclast precursors in primary cultures of calverial bone cells // J. Anat. Rec.— 1986.— **214**, N 1.— P. 32—40.
Owen M. Cell population kinetics of an osteogenic tissue // J. Cell Biol.— 1963.— **19**, N 1.— P. 19—32.
Prichard J. A Cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat // J. Anat.— 1952.— **86**.— P. 220—237.
Топпа Е. А. The cellular complement of the skeletal system studied thymidine (^{3}H TDR) during growth and aging // J. Biophys. Biochem. Cytol.— 1961.— **9**.— P. 813—824.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена АН УССР (Киев) Получено 12.07.89

УДК 591.471.4:591.2:[599.73+599.74]

П. Н. Кораблев, Р. И. Лихотоп

ОБ АСИММЕТРИИ ЧЕРЕПА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Число работ, в которых рассматривается феномен асимметрии черепа, невелико, почти все они посвящены анализу флуктуирующей асимметрии (Захаров и др., 1984; Александров и др., 1985; Захаров, 1987 и др.). Некоторые авторы приводят примеры общей асимметрии черепа, возникшей в естественных условиях (Dolgov, Rossolimo, 1964; Buchalczuk et al., 1981) или полученной экспериментальным путем при удалении мышц (Washburn, 1947 из Dolgov, Rossolimo, 1964; Никитюк, 1983). Врожденному искривлению черепа влево или вправо посвящено несколько строк в описании аномалий черепа диких животных у Х. С. Горегляда (1971). Это явление известно также и для человека (Сперанский, Зайченко, 1980). А. Г. Козинцев (1988) при работе с большой серией черепов человека (около 4 тыс. черепов, относящихся к 65 этническим группам) в 10,6 % случаев выявил следы правосторонней или левосторонней затылочной деформации, причем в некоторых выборках она составляла 50 %.